

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①① N° de publication :

**2 827 867**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

**01 10117**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : C 07 K 14/47, G 01 N 33/53, 33/68, C 12 Q 1/02

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 27.07.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 31.01.03 Bulletin 03/05.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement  
public à caractère scientifique et technologique — FR.*

⑦② Inventeur(s) : SABATIER JEAN MARC et DE  
WAARD MICHEL.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-  
CHY SARL.

⑤④ UTILISATION DE FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE LA SOUS-UNITÉ ALPHA-1 DES CANAUX CALCIIQUES,  
COMPORTANT LE CAS ECHEANT DES MUTATIONS, POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES D'INTERET  
THERAPEUTIQUE.

⑤⑦ La présente invention a pour objet l'utilisation de frag-  
ments peptidiques de la sous-unité  $\alpha$ -1 des canaux calci-  
ques de mammifères, de séquences dérivées par mutation  
desdits fragments, ou encore de cellules transformés par  
des séquences codant pour lesdits fragment ou séquences  
dérivées, pour le criblage de molécules d'intérêt thérapeu-  
tique.

FR 2 827 867 - A1



BEST AVAILABLE COPY

5           **UTILISATION DE FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE LA SOUS-UNITÉ  $\alpha$ -1  
DES CANAUX CALCIQUES, COMPORTANT LE CAS ECHEANT DES  
MUTATIONS, POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES D'INTERET  
THERAPEUTIQUE.**

---

10

La présente invention a pour objet l'utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha$ -1 des canaux calciques de mammifères, de séquences dérivées par mutation desdits fragments, ou encore de cellules transformées par des séquences codant pour lesdits fragment ou séquences dérivées, pour le criblage de molécules d'intérêt thérapeutique.

15

L'importance de la boucle I-II dans la régulation de l'activité du canal est connu depuis 1994, date à laquelle le site d'ancrage de la sous-unité  $\beta$  auxiliaire fut identifié (Pragnell M. et al., (1994), « Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit » Nature 368, 67-70:). Cette sous-unité  $\beta$  produit un nombre impressionnant de modifications fonctionnelles des canaux calciques.

20

La boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité  $\alpha$ -1 des canaux calcium haut-seuils dépendants du potentiel relie entre elles le premier et le second des quatre domaines hydrophobes. Elle joue un rôle essentiel dans 1) la régulation de l'activité du canal (propriétés d'activation et d'inactivation), 2) le niveau d'expression membranaire du canal (contrôle du niveau de rétention au sein du réticulum endoplasmique), 3) la régulation par les protéines exogènes (site de fixation du complexe  $G\beta\gamma$  des protéines G) et 4) la régulation par les sous-unité  $\beta$  des canaux calciques (site d'ancrage de la sous-unité  $\beta$  et premier site de régulation). D'après les résultats expérimentaux obtenus par les Inventeurs, il apparaît particulièrement intéressant d'utiliser la boucle I-II des canaux calciques pour la compréhension des rôles cellulaires de ces canaux calciques, pour l'inactivation neuronale, ou encore comme une cible pharmacologique pour la modulation de l'activité des canaux calciques.

30

En effet l'invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que l'expression exogène de la boucle I-II, lorsqu'elle est couplée à un segment transmembranaire, inhibe de manière substantielle l'expression membranaire de canaux calciques natifs. Ce résultat permet de réduire l'expression de canaux calciques dans un tissu donné afin d'appréhender la fonction cellulaire de ces canaux.

35

Les Inventeurs ont démontré que la boucle I-II est une boucle moléculaire organisatrice. Elle est couplée à d'autres boucles cytoplasmiques du canal calcique (séquences amino et carboxy-terminales, boucles II-III et III-IV). Ces interactions intra-moléculaires ont

5 pour fonction le contrôle de l'inactivation. Par exemple, l'interaction entre boucle I-II et boucle III-IV du canal calcium de type P/Q a joué un rôle primordial dans le contrôle de la cinétique d'inactivation du canal. De façon spectaculaire, ces interactions sont partiellement ou totalement interrompues par l'interaction de la boucle I-II avec la sous-unité  $\beta$ . En d'autres termes, la sous-unité  $\beta$  des canaux calcium entre en compétition avec les interactions  
10 intramoléculaires de la boucle I-II. Avec de tels résultats, on peut s'attendre à ce que le complexe  $G\beta\gamma$ , qui lui aussi se fixe sur la boucle I-II, puisse aussi entrer en compétition avec ces interactions moléculaires. Ce serait par le biais de ces compétitions que le complexe  $G\beta\gamma$  provoquerait la régulation du canal calcique (diminution de l'amplitude du courant calcique et ralentissement de la cinétique d'activation).

15 Ainsi, un des principaux buts de la présente invention est de développer un test de criblage visant à identifier des molécules capables de perturber les interactions intramoléculaires et l'activité ionique de la sous-unité  $\alpha_1$  des canaux calciques à hauts-seuils, lesdites molécules étant susceptibles d'être utilisées notamment dans le cadre du traitement de l'ischémie cérébrale ou de la neurodégénérescence

20 La présente invention a pour objet l'utilisation :

- de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha_1$  des canaux calciques de mammifères, lesdits fragments correspondant à la boucle I-II et/ou à la boucle III-IV de ladite sous-unité  $\alpha_1$ , ou correspondant à une séquence peptidique dérivée de cette boucle I-II ou III-IV, notamment par substitution, et/ou délétion, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ou  
25 correspondant à une partie peptidique de ladite boucle I-II, ou III-IV, ou d'une séquence dérivée de cette dernière, notamment à une partie peptidique d'au moins environ 5 acides aminés, ladite séquence dérivée et ladite partie de la boucle I-II ayant la propriété de ladite boucle I-II de se lier à la sous-unité  $\beta$  et à la boucle III-IV desdits canaux calciques, ladite séquence dérivée et ladite partie de la boucle III-IV ayant la propriété de ladite boucle III-IV  
30 de se lier à ladite boucle I-II,

- ou de séquences peptidiques mutées, dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés desdits fragments peptidiques susmentionnés de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha_1$  des canaux calciques dans la mesure où la ou les mutations en question affectent des acides aminés essentiels dans le cadre de l'expression des canaux calciques à la surface membranaire,  
35 et/ou de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés desdits fragments peptidiques susmentionnés de la boucle III-IV de la sous-unité  $\alpha_1$  des canaux

5 calciques, dans la mesure où la ou les mutations en question affectent des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques,

- ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour les fragments peptidiques susmentionnés de la boucle I-II et/ou de la boucle III-IV de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, ou codant pour les séquences peptidiques mutées  
10 susmentionnées,

pour la mise en œuvre de procédés de criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, à savoir du criblage de molécules  $\beta$  like susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies liées à  
15 une diminution anormale du nombre de canaux calciques telles que l'épilepsie, ou les dégénérescences neuronales,

- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, à savoir du criblage de molécules  $\beta$  like susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une augmentation du nombre de canaux  
20 calciques à la membrane plasmique aurait un effet bénéfique, telle que la maladie de Parkinson, les diabètes insulino-dépendants, ou le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton,,

- et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, à savoir du criblage de  
25 molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies liées à une augmentation anormale du nombre de canaux calciques telle que l'hypertrophie cardiaque,

- et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une diminution du nombre de canaux calciques à  
30 la membrane plasmique aurait un effet bénéfique, telle que l'épilepsie, l'hypertension, l'angine de poitrine, ou l'ischémie cérébrale,

- et/ou de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre de la stimulation ou de l'inhibition de la  
35 communication neuronale, notamment dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués

5 dans la libération des neurotransmetteurs aurait un effet bénéfique, telles que les épilepsies, les ataxies, les migraines, la maladie de Parkinson, ou les ischémies cérébrales.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de fragments peptidiques correspondant à la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$ , ou à une séquence peptidique dérivée, ou à une partie de cette boucle I-II, ou de cellules transformées par des  
10 séquences nucléotidiques codant pour lesdits fragments, tels que définis ci-dessus, pour la mise en œuvre de procédés de criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies ci-dessus,
- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes  
15 cellulaires, telles que définies dans la revendication 1.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée :

- de la séquence peptidique correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

20 SGEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEVILAEDETDVEQRHPF  
DGALRRATIKKSKTDLLHPPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSFFHKKERR  
MRFYIRRMVKTQ

- ou de la séquence peptidique correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines, ladite séquence correspondant à la  
25 séquence SEQ ID NO : 4 suivante :

SGEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEVILAEDETDGEQRHPF  
DGALRRRTTIKKSKTDLLNPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSTFFHKKERR  
MRFYIRRMVKTQ

- ou de cellules transformées avec les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et  
30 SEQ ID NO : 3 suivantes codant respectivement pour les séquences peptidiques SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 susmentionnées :

SEQ ID N°1 :

35 tcaggggagtttgccaaagaaaggagcggggtggagaaccggcgcgcatctctgaagctgcggcggcagcagcagattgaacgc  
gagctcaacgggtacatggagtggatctcaaaagcagaagaggtgatcctcgagaggacgagaccgacgtggagcagagacatc  
cctttgatggagctctgcggagagccactatcaagaagagcaagacggacctgctccaccagaggaggcggaggatcagctggcc  
gacatcgctcctcggtggggtctccctttgccgagccagcattaaaagtccaagctggagaactcgagttttccacaaaaagagag  
gagaatgcgtttctacatccgtcgcgatggtcaaaactcag

## 5 SEQ ID N°3

tcagggg agtttgccaa agaaaggga cgggtggaga accggcgggc tttctgaag ctgaggcggc aacaacagat  
 tgaacgtgag ctcaatgggt acatggaatg gatctcaaaa gcagaagagg tgatcctcgc cgaggatgaa actgacgggg  
 agcagaggca tccctttgat ggagctctgc ggagaaccac cataaagaaa agcaagacag atttgctcaa ccccgaagag  
 gctgaggatc agctggctga tatagcctct gtgggttctc ccttcgccg agccagcatt aaaagtgcc aagctggagaa  
 10 ctcgacctt ttccacaaaa aggagaggag gatgcgtttc tacatccgcc gcatgtcaa aactcag

De préférence, dans le cas de l'utilisation susmentionnée de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  ayant une taille supérieure à environs 5 acides aminés, lesdits fragments sont fusionnés du côté N-terminal à une séquence peptidique transmembranaire, à savoir une séquence peptidique ayant pour effet de maintenir lesdits fragments peptidiques dans la membrane cellulaire, telle que la séquence transmembranaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur CD8 humain contenue dans la séquence SEQ ID NO : 5 suivante :

LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCNHR

En variante, l'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de cellules transformées avec une séquence nucléotidique recombinante exogène codant pour une séquence peptidique transmembranaire telle que définie ci-dessus, cette dernière séquence étant située en amont de la séquence codant pour le fragment peptidique susmentionné de la sous-unité  $\alpha 1$ .

L'invention a également pour objet tout procédé de criblage de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies ci-dessus, et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définis ci-dessus, avec des cellules exprimant des canaux calciques pendant un temps suffisant pour que le nombre de canaux calciques diminue de manière significative à la surface desdites cellules, puis avec des molécules à tester,

- ou mise en présence de cellules transformées à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définis ci-dessus, réduisant ainsi le nombre de canaux calciques à la surface desdites cellules, avec des molécules à tester,

- détection d'une éventuelle augmentation du nombre de canaux calciques à la surface des cellules transformées témoignant de l'effet des molécules testées d'augmentation du

- 5 nombre de canaux calciques à la surface des membranes cellulaire, notamment par mesures électrophysiologiques, ou à l'aide de sondes fluorescentes ou radioactives.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, la ou les mutations en  
10 question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'expression des canaux calciques à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet d'augmenter ou de diminuer l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les  
15 membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies ci-dessus,
- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies ci-dessus,
- et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, telles que définies ci-dessus,
- 20 - et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'augmenter l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, lesdites séquences peptidiques  
25 étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 383, 395, 396, 398, 427, et 428 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de Q en position 24, W en position 36, I en position 37, K en position 39, K en position 68, et K en position 69, est substitué par un  
30 acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine.

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet de diminuer l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions  
35 387, 422, et 423 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou aux positions équivalentes de la sous-unité Cav2.1 humaine, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un

- 5 au moins de R en position 28, R en position 63, et R en position 64, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine.

L'invention concerne également tout procédé de criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies ci-dessus,
  - 10 - et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies ci-dessus,
  - et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, telles que définies dans la revendication 1,
  - 15 - et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies ci-dessus,
- caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définies ci-dessus, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur
  - 20 capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles I-II,
  - sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles I-II et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées, notamment par l'utilisation de la technique de Biacore (O'Shannessy DJ et al. (1992) « Immobilization chemistries
  - 25 suitable for use in the Biacore surface plasmon resonance detector » Anal Biochem. 205, 132-136) basée sur un principe physique et optique d'interaction moléculaire,
  - le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur l'augmentation ou la diminution du nombre de canaux calciques à
  - 30 la surface desdites cellules, notamment par mesures électrophysiologiques, ou à l'aide de sondes fluorescentes ou radioactives.

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, la ou les mutations en question

35 affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques présents à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet de moduler l'activité des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules



- 5 régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins  
10 des acides aminés situés aux positions 387 et 388 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de R en position 28, et E en position 29, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment R28 est substitué par une alanine ou par E, et E29 est substitué par une alanine.

- 15 L'invention concerne également tout procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle I-II de la sous-unité  
20  $\alpha 1$  tels que définies ci-dessus, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles I-II,

- sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles I-II et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées, notamment par la technique  
25 Biacore susmentionnée,

- le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur la régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs desdites cellules, notamment  
30 par mesures électrophysiologiques.

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de fragments peptidiques correspondant à la boucle III-IV de la sous-unité  $\alpha 1$ , ou à une séquence peptidique dérivée, ou à une partie de cette boucle III-IV, ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour lesdits fragments, tels que définis ci-dessus, pour la  
35 mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus.

5 L'invention a plus particulièrement l'utilisation susmentionnée :

- de la séquence peptidique correspondant à la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines ou de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7 suivante :

ITFQEQGDKMMEEYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNKQSFQYRMWQFVVS

10 - ou des cellules transformées avec la séquence nucléotidique codant pour la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 6 suivante :

at caccttcag gagcaagggg acaagatgat ggaggaatac agcctggaga aaaatgagag ggctgcatt gatttcgcca  
tcagcgccaa gccgctgacc cgacacatgc cgcagaacaa gcagagcttc cagtaccgca tgtggcagti cgtggtgtct  
15 ccg

- ou de cellules transformées avec la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 6 et SEQ ID NO : 8 codant respectivement pour les séquences peptidiques SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 9 susmentionnées codant pour la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 8 suivante :

atcacct tccaggagca gggcgacaag atgatggagg agtacagctt ggagaaaaac gagagggcct gcatcgactt  
cgccatcagt gccaagccgc tgaccaggca catgccccag aacaagcaga gcttcagta ccgcatgtgg cagttcgtgg  
tgtccccg

De préférence dans le cas de l'utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  ayant une taille supérieure à environ 5 acides aminés, lesdits fragments sont fusionnés ou non du côté N-terminal à une séquence peptidique transmembranaire, à savoir une séquence peptidique ayant pour effet de maintenir lesdits fragments peptidiques dans la membrane cellulaire, telle que la séquence transmembranaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur CD8 humain contenue dans la séquence SEQ ID NO : 5 suivante :

30 LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR

En variante, l'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de cellules transformées avec une séquence nucléotidique recombinante exogène codant pour une séquence peptidique transmembranaire telle que définie ci-dessus, cette dernière séquence étant située en amont de la séquence codant pour le fragment peptidique susmentionné de la sous-unité  $\alpha 1$ .

5 L'invention a également pour objet tout procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que ci-dessus,  
10 avec des cellules exprimant des canaux calciques pendant un temps suffisant pour que l'état d'inactivation des canaux soit modifié, puis avec des molécules à tester,

- ou mise en présence de cellules transformées à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définis ci-dessus, avec des molécules à tester,

15 - détection de l'effet des molécules testées sur l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, notamment par mesures électrophysiologiques.

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle  
20 III-IV de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques présents à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet de moduler l'activité des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des  
25 neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés de la séquence peptidique correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7.

30 L'invention concerne également tout procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle III-IV de la sous-  
35 unité  $\alpha 1$  tels que définies ci-dessus, avec des molécules à tester déjà sélectionner pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles III-IV,

5 - sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles III-IV et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées, notamment selon la technique Biacore susmentionnée,

- le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des  
10 molécules sélectionnées sur la régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs desdites cellules, notamment par mesures électrophysiologiques.

L'invention a également pour objet les séquences peptidiques suivantes :

- les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de Q  
15 en position 24, W en position 36, I en position 37, K en position 39, K en position 68, et K en position 69, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine,

- les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de R en position 28, R en position 63, et R en position 64, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine,

20 - les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de R en position 28, et E en position 29, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment R28 est substitué par une alanine ou par E, et E29 est substitué par une alanine.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide des résultats expérimentaux qui suivent :

25 **I- Démonstration de la diminution du nombre de canaux calciques à la surface membranaire des cellules chromaffines bovins et des cellules granulaires du cervelet de rat.**

Les résultats des Inventeurs démontrent que l'expression de la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 dans les cellules chromaffines de bovins ou les cellules granulaires de cervelet  
30 induit une diminution notable des canaux calciques haut-seuils à la surface membranaire de ces cellules. Les mesures effectuées montrent que plus de 50% du courant calcique haut-seuil est diminué dans ces cellules suite à l'expression de cette séquence.

L'expression de la boucle I-II du canal  $Ca_v2.1$  est induite suite à une méthode de transfection cellulaire (grâce à un agent de transfection : lipofectamine, fugène, etc...). Afin  
35 d'avoir la capacité de fixer les sous-unités  $\beta$  endogènes à ces cellules, nous avons constaté que la capacité de cette séquence I-II à réduire l'expression à la membrane plasmique des canaux calciques haut-seuils endogènes est facilitée par son couplage à un segment transmembranaire. Les Inventeurs ont utilisé pour leurs expériences le segment transmembranaire de la chaîne  $\alpha$

5 du récepteur CD8 humain, couplé à la partie amino-terminale de la boucle I-II. Afin de faciliter la détection des cellules transfectées, la partie carboxy-terminale de la boucle I-II a été couplée à la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) qui possède la propriété de fluorescence verte (facilement détectable en microscopie à fluorescence). La figure 1A illustre la construction utilisée pour ces expériences. En figure 1B, est illustrée la séquence en acide-aminés de la  
10 séquence transmembranaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur CD8.

Séquence transmembranaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur CD8 humain (contenu dans) :  
LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR

## 15 II- Démonstration de l'importance des acides aminés Arg 387 et Glu 388 de la séquence $\text{Ca}_v2.1$ de lapin dans l'inactivation de ce canal.

Les résultats expérimentaux obtenus démontrent que les acides aminés de la boucle I-II du canal calcique  $\text{Ca}_v2.1$  interviennent dans l'inactivation de ce canal. Deux modes de participation sont possibles :

20 1- En absence de sous-unité  $\beta$ , ces deux acides aminés sont impliqués dans une interaction moléculaire avec la boucle III-IV de la sous-unité  $\text{Ca}_v2.1$  (Figures 2 et 3). Si ces interactions sont interrompues, soit par mutagenèse des acides aminés Arg 387 ou Glu 388 (Figure 4), soit en exprimant la boucle III-IV (qui peut alors entrer en compétition avec l'interaction naturelle entre les boucles I-II et III-IV du canal  $\text{Ca}_v2.1$  ; Figure 5), l'inactivation du canal calcique est facilitée. Une inactivation  
25 facilitée représente, soit une transition accélérée de l'état ouvert du canal vers son état inactivé, soit une diminution du nombre de canaux activables à un potentiel membranaire donné de la cellule. Les méthodologies permettant la mesure des courants calciques et l'analyse de l'inactivation sont données en annexe D.

30 2- En présence de sous-unité  $\beta$  (la configuration normale du canal à la membrane plasmique), la charge électrique portée par les chaînes radicales de ces acides aminés (charge + pour Arg 387 et charge - pour Glu 388) joue un rôle dans l'inactivation de ce canal.

Les résultats démontrent que dans ces deux cas de figures, ces acides aminés peuvent être prises comme cible d'une intervention pharmacologique directe pour moduler  
35 l'inactivation des canaux calciques. La présence de ces acides aminés dans la plupart des canaux calciques neuronaux ( $\text{Ca}_v2.1$ ,  $\text{Ca}_v2.2$  et  $\text{Ca}_v2.3$ ), et chez la plupart des espèces, y

- 5 compris chez l'homme suggère fortement que ces acides aminés interviennent également dans l'inactivation de ces canaux.

**Figure 2 :** Fixation de la boucle I-II de  $\text{Ca}_v2.1$  sur différentes boucles intracellulaires. Une fixation de I-II est évidente sur la boucle III-IV de  $\text{Ca}_v2.1$ . Cette boucle III-IV a été exprimée et purifiée comme une protéine de fusion GST (Glutathion-S-Transférase). La protéine I-II du canal a été traduite in vitro et marquée par un acide aminé radioactif ( $^{35}\text{S}$ -methionine) pour suivre sa fixation sur la protéine de fusion GST-III-IV.

**Figure 3 :** Représentation schématique démontrant les interactions intramoléculaires entre les différentes boucles du canal  $\text{Ca}_v2.1$ . La flèche verte illustre l'interaction entre la boucle I-II et la boucle III-IV de ce canal. PM = membrane plasmique.

15 **Figure 4 :** Démonstration de la perte de fixation de la boucle I-II du canal  $\text{Ca}_v2.1$  sur la protéine de fusion GST-III-IV suite à la mutation des acides aminés Arg 387 ou Glu 388. Ces deux acides aminés sont donc indispensables à la fixation de la boucle I-II sur la boucle III-IV en absence de la sous-unités  $\beta$  du canal calcium.

20 **Figure 5 :** L'expression de la boucle III-IV accélère la cinétique d'inactivation du canal  $\text{Ca}_v2.1$ . Cette accélération est similaire si la boucle III-IV exprimée est associée à la membrane plasmique (gauche, via un couplage en position amino-terminale avec la chaîne  $\alpha$  du récepteur CD8 humain) ou est libre dans le cytoplasme (droite, injection d'un peptide représentant les 40 acides aminés carboxy-terminal de la boucle III-IV).

25 **III- Démonstration de l'importance de plusieurs acides aminés de la boucle I-II de la séquence  $\text{Ca}_v2.1$  de lapin dans la rétention de ce canal au niveau du réticulum endoplasmique.**

Les résultats de mutagenèse de la boucle I-II de la sous-unité  $\text{Ca}_v2.1$  et de l'expression dans l'ovocyte de Xénope des mutants correspondants démontrent qu'un certain nombre d'acide aminés de la boucle I-II peuvent être choisies comme cible pour augmenter l'adressage membranaire des canaux calciques haut-seuils. Nous pouvons classer ces acides aminés en deux catégories : (i) les acides aminés dont la fonction est indépendante de la sous-unité  $\beta$  des canaux calciques et dont la mutation induit une augmentation d'expression des canaux calciques à la surface de la membrane, et (ii) les acides aminés dont la mutation seule ne contribue pas à une expression de surface facilitée du canal  $\text{Ca}_v2.1$  lorsqu'il est exprimé seul, mais plutôt à une facilitation de l'action des sous-unités  $\beta$ . L'action desdites sous-unités  $\beta$  étant justement de faciliter l'expression des canaux calciques haut-seuils, l'expression à la

5 surface cellulaire de l'ensemble du complexe  $\text{Ca}_v2.1/\beta$  est également facilitée par la mutagenèse de ces résidus. L'importance des acides aminés  $\beta$ -indépendant est démontrée dans la figure 6, alors que celle des résidus  $\beta$ -dépendants est illustrée en figure 7. La figure 8 récapitule la position des acides aminés de la boucle I-II dont la mutation peut faciliter l'expression des canaux calciques

10 **Figure 6 :** Expression de sous-unités  $\text{Ca}_v2.1$  mutés augmentant l'expression du canal (en absence de sous-unité  $\beta$ ). Mesure en densité de courants à la surface de la membrane plasmique des ovocytes de Xénopes. Voir annexe A ci-après pour la méthodologie d'expression et d'enregistrement des courants électriques.

15 **Figure 7 :** Expression de sous-unités  $\text{Ca}_v2.1$  mutés facilitant l'action de stimulation d'expression de la surface membranaire des canaux calciques par la sous-unité  $\beta$ . Voir annexe D pour la méthodologie d'expression et d'enregistrement des courants électriques.

Ci-après sont représentées les positions des acides aminés dont la mutation favorise l'expression à la surface de la membrane plasmique du canal  $\text{Ca}_v2.1$ . En gras, acides aminés  $\beta$ -indépendant, et souligné, les acides aminés  $\beta$ -dépendants.

20 SGEFAKERERVENRRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEDEVILAEDETDVEQRHP

|                      //                      |  
383                      395 396                      398

FDGALRRATIKKSKTDLLHPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSFFHKKERR

25 |  
427 + 428 (double mutation)

MRFYIRRMVKTQ

30 On peut aussi identifier la position des acides aminés dont la mutation entraîne une diminution de l'expression à la surface des cellules. Cette information est donnée à titre d'exemple ci-après.

Position des acides aminés dont la mutation entraîne une diminution notable d'expression du canal  $\text{Ca}_v2.1$  à la membrane (en présence et absence de sous-unité  $\beta$ ).

SGEFAKERERVENRRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEDEVILAEDETDVEQRHP

35

387

5 FDGALRRATIKKSKTDLLHP<sup>EE</sup>AEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENS<sup>SS</sup>FFHKKERR

|  
422 - 423

MRFYIRRMVKTQ

10

Afin d'étendre la validité de nos résultats, nous avons aligné la séquence de la boucle I-II du canal Ca<sub>v</sub>2.1 de lapin à celle de la séquence I-II du canal Ca<sub>v</sub>2.1 humain. Les positions des acides aminés essentiels à l'ensemble des fonctions citées sont indiquées en gras ci-après.

Alignement des séquences de Ca<sub>v</sub>2.1 de lapin et humain. En gras, acide aminés  
15 essentiels. Souligné : les acides aminés différents entre les deux séquences.

Cav2.1

humain

SGEFAKERERVENRR<sup>AF</sup>FLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAE<sup>EE</sup>VIL

Cav2.1

lapin

20 SGEFAKERERVENRR<sup>AF</sup>FLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAE<sup>EE</sup>VIL

AEDETDGEQRHPFDGALRR<sup>TT</sup>IKKSKTDLLNP<sup>EE</sup>AEDQLADIASVGSPFARASIKS

AEDETDVEQRHPFDGALRR<sup>AT</sup>IKKSKTDLLHP<sup>EE</sup>AEDQLADIASVGSPFARASIKS

25

AKLENS<sup>TT</sup>FFHKKERRMRFYIRRMVKTQ

AKLENS<sup>SS</sup>FFHKKERRMRFYIRRMVKTQ



5

## Annexe A

Expression du canal  $\text{Ca}_v2.1$  dans l'ovocyte de Xénope, mesure électrophysiologique des courants calciques et analyse des propriétés d'inactivation du canal calcique.

10

*Expression*

Les ovocytes de Xénopes sont prélevés aux stades V et VI à partir d'ovaires de grenouille *Xenopus laevis* d'Afrique du sud et maintenus en solution saline classique (milieu de Barth). Les cellules sont traitées à la collagenase type IA (2 mg/ml) pendant deux heures et  
15 les membranes folliculaires sont éliminées manuellement. Les ovocytes sont maintenus en milieu DNOM (defined nutrient oocyte medium) durant 2 jours avant injection de cRNA codant pour le canal  $\text{Ca}_v2.1$ . L'injection de ce cRNA codant pour le canal sauvage ou muté est effectué à une concentration de 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Dans les cas de coinjection d'autres cRNA (exemple : CD8-III-IV, III-IV, etc...), ces cRNA sont injectés à une concentration de 0.1  
20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Les injections de peptide III-IV sont effectuées à une concentration finale intracellulaire de 10  $\mu\text{M}$ . Dans tous les cas de figure, le volume d'injection n'excède pas 50 nl par ovocyte. Suite aux injections de cRNA, les cellules sont conservées à 16°C en milieu DNOM pendant au minimum 4-5 jours avant de poursuivre avec les enregistrements électrophysiologiques.

25

*Mesures électrophysiologiques*

Nous avons appliqué la technique de voltage-clamp à deux électrodes pour les enregistrements de courants  $\text{Ba}^{2+}$  (le  $\text{Ba}^{2+}$  est plus perméable que le  $\text{Ca}^{2+}$  au travers des canaux calcium à haut-seuils et facilite nos analyses). Les enregistrements sont effectués avec un  
30 amplificateur GeneClamp de chez Axon Instruments (Foster City, CA). Le milieu d'enregistrement extracellulaire contient (en mM):  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  40, NaOH 50, KCl 3, HEPES 5, acide niflumique 1, pH 7.4 avec l'acide méthane sulfonique. Les électrodes sont remplies avec (en mM) KCl 140, EGTA 10 et HEPES 10 (pH 7.2 avec du KOH) et ont des résistances électriques comprises entre 0.5 et 1 M $\Omega$ . Les enregistrements de courant électriques sont filtrés  
35 « on-line » à 2 kHz, le courant de fuite est soustrait par un protocole P/6, et échantillonné à 5-10 kHz. Les données sont analysées avec le suite de logiciels pCLAMP version 6.03 (Axon Instruments).

5      *Analyse des propriétés d'inactivation du canal  $Ca_v2.1$*

Afin d'établir des courbes d'inactivation en fonction du potentiel membranaire de cellule, les ovocytes sont dépolarisés pendant au moins 30 secondes à une valeur de potentiel donnée (entre  $-100$  et  $10$  mV ; potentiel de maintien), puis le courant calcique est déclenché par une dépolarisation cellulaire à  $+20$  mV. Cette procédure est répétée plusieurs fois pour des  
10 valeurs de potentiel de maintien croissant (de  $10$  mV en  $10$  mV). L'amplitude maximale des courants  $Ba^{2+}$  ainsi obtenues pour chaque dépolarisation à  $+20$  mV est comparée à l'amplitude du courant maximal obtenu par une dépolarisation à partir du potentiel de  $-100$  mV vers  $+20$  mV (valeur référence correspondant à  $0\%$  d'inactivation des canaux). L'inactivation des canaux calciques est aussi déclenchée par une dépolarisation maintenue à  $+20$  mV (à partir  
15 d'une valeur de maintien de  $-100$  mV). Le décours cinétique décroissant du courant illustre le processus d'inactivation des canaux calciques qui est déclenché par la dépolarisation à  $+20$  mV. Pour comparer les différences en cinétiques d'inactivation, nous avons choisis le temps nécessaire à la demi-inactivation des canaux calciques comme valeur de référence.

5

## REVENDICATIONS

## 1. Utilisation :

- de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques de mammifères, lesdits fragments correspondant à la boucle I-II et/ou à la boucle III-IV de ladite sous-unité  $\alpha 1$ , ou correspondant à une séquence peptidique dérivée de cette boucle I-II ou III-IV, notamment par substitution, et/ou délétion, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ou correspondant à une partie peptidique de ladite boucle I-II, ou III-IV, ou d'une séquence dérivée de cette dernière, notamment à une partie peptidique d'au moins environ 5 acides aminés, ladite séquence dérivée et ladite partie de la boucle I-II ayant la propriété de ladite boucle I-II de se lier à la sous-unité  $\beta$  et à la boucle III-IV desdits canaux calciques, ladite séquence dérivée et ladite partie de la boucle III-IV ayant la propriété de ladite boucle III-IV de se lier à ladite boucle I-II,

- ou de séquences peptidiques mutées, dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés desdits fragments peptidiques susmentionnés de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques dans la mesure où la ou les mutations en question affectent des acides aminés essentiels dans le cadre de l'expression des canaux calciques à la surface membranaire, et/ou de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés desdits fragments peptidiques susmentionnés de la boucle III-IV de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, dans la mesure où la ou les mutations en question affectent des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques,

- ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour les fragments peptidiques susmentionnés de la boucle I-II et/ou de la boucle III-IV de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, ou codant pour les séquences peptidiques mutées susmentionnées,

pour la mise en œuvre de procédés de criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, à savoir du criblage de molécules  $\beta$  like susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies liées à une diminution anormale du nombre de canaux calciques telles que l'épilepsie, ou les dégénérescences neuronales,

- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, à savoir du criblage de molécules  $\beta$  like susceptibles d'être utilisées dans le cadre

5 du traitement de pathologies contre lesquelles une augmentation du nombre de canaux calciques à la membrane plasmique aurait un effet bénéfique, telle que la maladie de Parkinson, les diabètes insulino-dépendants, ou le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton,,  
10

- et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies liées à une augmentation anormale du nombre de canaux calciques telle que l'hypertrophie cardiaque,  
15

- et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une diminution du nombre de canaux calciques à la membrane plasmique aurait un effet bénéfique, telle que l'épilepsie, l'hypertension, l'angine de poitrine, ou l'ischémie cérébrale,  
20

- et/ou de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre de la stimulation ou de l'inhibition de la communication neuronale, notamment dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs aurait un effet bénéfique, telles que les épilepsies, les ataxies, les migraines, la maladie de Parkinson, ou les ischémies cérébrales.  
25

2. Utilisation selon la revendication 1 de fragments peptidiques correspondant à la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$ , ou à une séquence peptidique dérivée, ou à une partie de cette boucle I-II, ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour lesdits fragments, tels que définis dans la revendication 1, pour la mise en œuvre de procédés de criblage :  
30

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies dans la revendication 1,  
35

- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1.

## 5 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2 :

- de la séquence peptidique correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

SGEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEVILAEDETDVEQRHPF  
10 DGALRRATIKKSKTDLLHPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSFFHKKERR  
MRFYIRRMVKTQ

- ou de la séquence peptidique correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 4 suivante :

15 SGEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEVILAEDETDGEQRHPF  
DGALRRRTTIKKSKTDLLNPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSFFHKKERR  
MRFYIRRMVKTQ

- ou de cellules transformées avec les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 3 suivantes codant respectivement pour les séquences peptidiques SEQ ID NO :  
20 2 et SEQ ID NO : 4 susmentionnées :

## SEQ ID N°1 :

tcaggggagtttgccaaagaaaggagcggggtggagaaccggcgcgcatctcgaagctgcggcggcagcagcagattgaacgc  
gagctcaacgggtacatggagtggatctcaaaagcagaagaggtgatcctcgcagaggacgagaccgacgtggagcagagacatc  
25 cctttgatggagctctgcggagagccactatcaagaagagcaagacggacgtgctccaccagaggaggcgaggatcagctggcc  
gacatcgctccgtgggggtctccctttgccgagccagcattaaaagtccaagctggagaactcgagttttccacaaaaagagag  
gagaatgcgtttctacatccgtcgcatggtcaaaactcag

## SEQ ID N°3

30 tcagggg agtttgccaa agaaagggaa cgggtggaga accggcgggc tttctgaag ctgaggcggc aacaacagat  
tgaacgtgag ctcaatgggt acatggaatg gatctcaaaa gcagaagagg tgatcctcgc cgaggatgaa actgacgggg  
agcagaggca tccctttgat ggagctctgc ggagaaccac cataaagaaa agcaagacag atttgctcaa ccccgaagag  
gctgaggatc agctggctga tatagcctct gtgggttctc ccttcgccc agccagcatt aaaagtcca agctggagaa  
ctcgaccttt tttcacaaaa aggagaggag gatgcgttctacatccgcc gcatggtcaa aactcag

35

4. Utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  selon l'une des revendications 1 à 3, lesdits fragments étant fusionnés du côté N-terminal à une séquence peptidique transmembranaire, à savoir une séquence peptidique ayant pour effet de

- 5 maintenir lesdits fragments peptidiques dans la membrane cellulaire, telle que la séquence transmembranaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur CD8 humain contenue dans la séquence SEQ ID NO : 5 suivante :

LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR

- 10 ou de cellules transformées avec une séquence nucléotidique recombinante exogène codant pour une séquence peptidique transmembranaire telle que définie ci-dessus, cette dernière séquence étant située en amont de la séquence codant pour le fragment peptidique susmentionné de la sous-unité  $\alpha 1$ .

- 15 5. Procédé de criblage de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies dans la revendication 1, et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 20 - mise en présence de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définis dans l'une des revendications 2 à 4, avec des cellules exprimant des canaux calciques pendant un temps suffisant pour que le nombre de canaux calciques diminue de manière significative à la surface desdites cellules, puis avec des molécules à tester,

- 25 - ou mise en présence de cellules transformées à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définis dans l'une des revendications 2 à 4, réduisant ainsi le nombre de canaux calciques à la surface desdites cellules, avec des molécules à tester,

- détection d'une éventuelle augmentation du nombre de canaux calciques à la surface des cellules transformées témoignant de l'effet des molécules testées d'augmentation du nombre de canaux calciques à la surface des membranes cellulaire.

30

6. Utilisation selon la revendication 1 de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'expression des canaux calciques à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet d'augmenter ou de diminuer l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage :
- 35

5           - de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies dans la revendication 1,

          - et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1,

10          - et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, telles que définies dans la revendication 1,

          - et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1.

15

7. Utilisation selon la revendication 6 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'augmenter l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 383, 395, 396, 398, 427, et 428 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de Q en position 24, W en position 36, I en position 37, K en position 39, K en position 68, et K en position 69, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine.

25

8. Utilisation selon la revendication 6 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet de diminuer l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 387, 422, et 423 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de R en position 28, R en position 63, et R en position 64, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine.

35

9. Procédé de criblage :

          - de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies dans la revendication 1,

- 5           - et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1,
- et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, telles que définies dans la revendication 1,
- 10          - et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1,
- caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définies dans la revendication 1, 6 ou 7, avec des molécules à tester déjà
- 15       sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles I-II,
- sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles I-II et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées,
- le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente
- 20       avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur l'augmentation ou la diminution du nombre de canaux calciques à la surface desdites cellules.

10. Utilisation selon la revendication 1 de séquences peptidiques dérivées par mutation

25       d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'activité des canaux calciques à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet de moduler l'activité des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux

30       calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1.

11. Utilisation selon la revendication 10 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences

35       peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 387 et 388 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de R en position 28, et E en position 29, est



- 5 substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment R28 est substitué par une alanine ou par E et E29 est substitué par une alanine.

12. Procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies  
10 dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définies dans la revendication 10 ou 11, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles I-II,
- 15 - sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles I-II et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées,
- le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur la régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques  
20 neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs desdites cellules.

13. Utilisation selon la revendication 1 de fragments peptidiques correspondant à la boucle III-IV de la sous-unité  $\alpha 1$ , ou à une séquence peptidique dérivée, ou à une partie de cette boucle III-IV, ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour  
25 lesdits fragments, tels que définis dans la revendication 1, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1.

30 14. Utilisation selon la revendication 1 ou 13 :

- de la séquence peptidique correspondant à la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines ou de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7 suivante :

ITFQEQGDKMMEEYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNKQSFQYRMWQFVVSP

35

- ou des cellules transformées avec la séquence nucléotidique codant pour la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 6 suivante :

5

at caccttcag gagcaagggg acaagatgat ggaggaatac agcctggaga aaaatgagag ggcctgcatt gatttcgcca  
tcagcgccaa gccgtgacc cgacacatgc cgcagaacaa gcagagcttc cagtaccgca tgtggcagtt cgtggtgtct  
ccg

10

- ou de cellules transformées avec la séquence nucléotidique codant pour la boucle III-  
IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ladite  
séquence correspondant à la séquence SEQ ID N°8 suivante :

15

atcacct tccaggagca gggcgacaag atgatggagg agtacagctt ggagaaaaac gagagggcct gcatcgactt  
cgccatcagt gccaagccgc tgaccaggca catgccccag aacaagcaga gcttcagta ccgcatgtgg cagttcgtgg  
tgtccccg

20

15. Utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  selon l'une des  
revendications 1, 13 et 14, lesdits fragments étant fusionnés du côté N-terminal à une  
séquence peptidique transmembranaire, à savoir une séquence peptidique ayant pour effet de  
maintenir lesdits fragments peptidiques dans la membrane cellulaire, telle que la séquence  
transmembranaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur CD8 humain contenue dans la séquence SEQ  
ID NO : 5 suivante :

LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHR

25

ou de cellules transformées avec une séquence nucléotidique recombinante exogène  
codant pour une séquence peptidique transmembranaire telle que définie ci-dessus, cette  
dernière séquence étant située en amont de la séquence codant pour le fragment peptidique  
susmentionné de la sous-unité  $\alpha 1$ .

30

16. Procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux  
calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies  
dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

35

- mise en présence de fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définis dans  
l'une des revendications 13 à 15, avec des cellules exprimant des canaux calciques pendant un  
temps suffisant pour que l'état d'inactivation des canaux soit modifié, puis avec des  
molécules à tester,

- ou mise en présence de cellules transformées à l'aide de séquences nucléotidiques  
codant pour des fragments peptidiques de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définis dans l'une des  
revendications 13 à 15, avec des molécules à tester,

- 5 - détection de l'effet des molécules testées sur l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs.

17. Utilisation selon la revendication 1 de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle III-IV de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'activation des canaux calciques à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet d'activer ou d'inactiver les canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1.

18. Utilisation selon la revendication 17 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés de la séquence peptidique correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7.

19. Procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 25 - mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle III-IV de la sous-unité  $\alpha 1$  tels que définies dans la revendication 17 ou 18, avec des molécules à tester déjà sélectionner pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles III-IV,
- sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles III-IV et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées,
- 30 - le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur la régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs desdites cellules.

35

5           20. Séquences peptidiques choisies parmi :

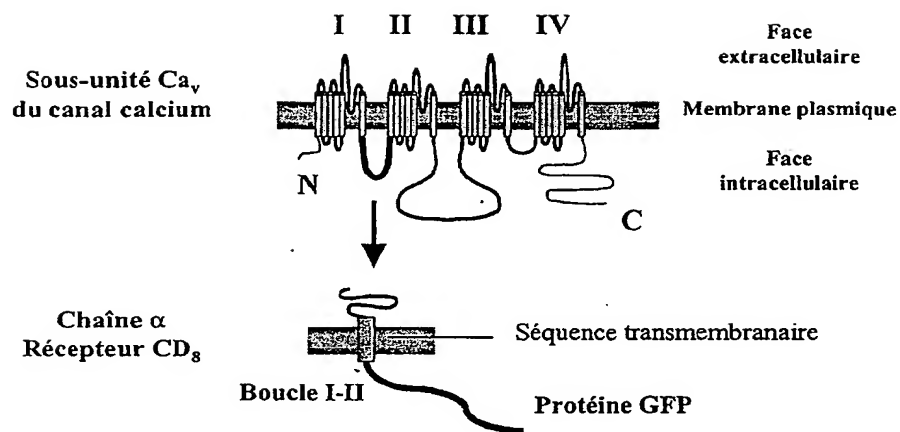
- les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de Q en position 24, W en position 36, I en position 37, K en position 39, K en position 68, et K en position 69, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine,

10           - les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de R en position 28, R en position 63, et R en position 64, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine,

- les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de R en position 28, et E en position 29, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment R28 est substitué par une alanine ou par E, et E29 est substitué par une alanine.

FIGURE 1

A



B

FIGURE 2

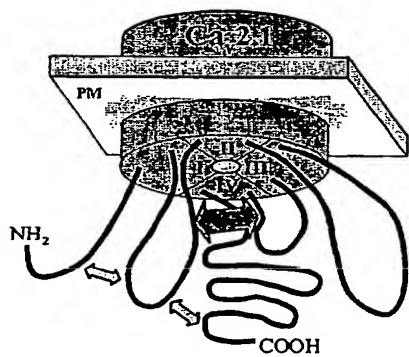
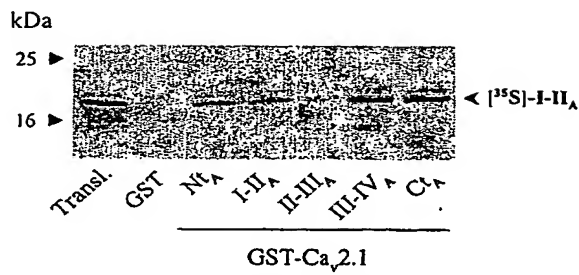


FIGURE 3

FIGURE 4

# Autoradiogram

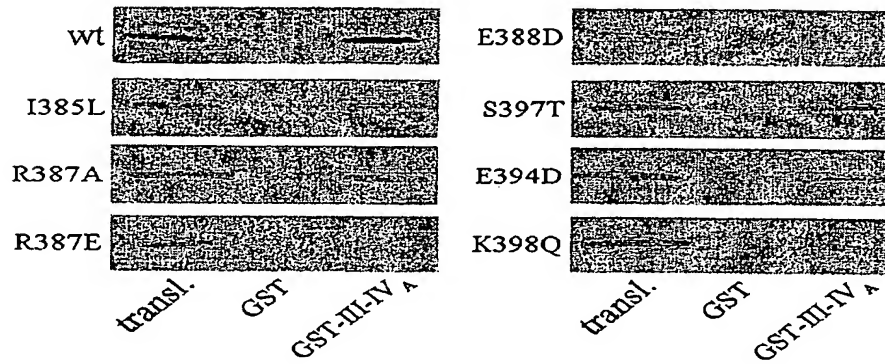


FIGURE 5 :

Boucle III-IV associée à la membrane

Boucle III-IV en forme libre

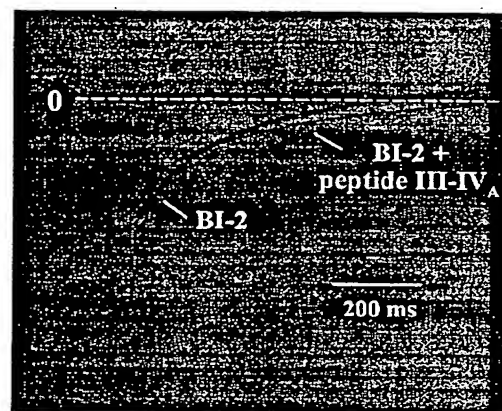
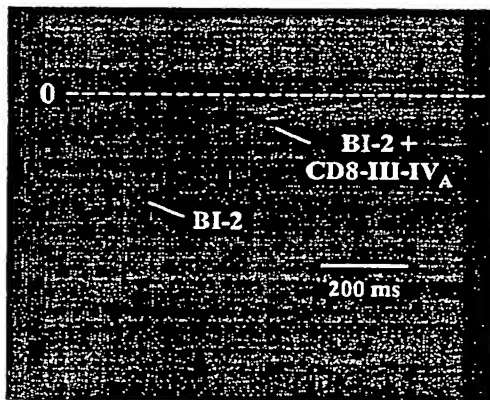


FIGURE 6 :

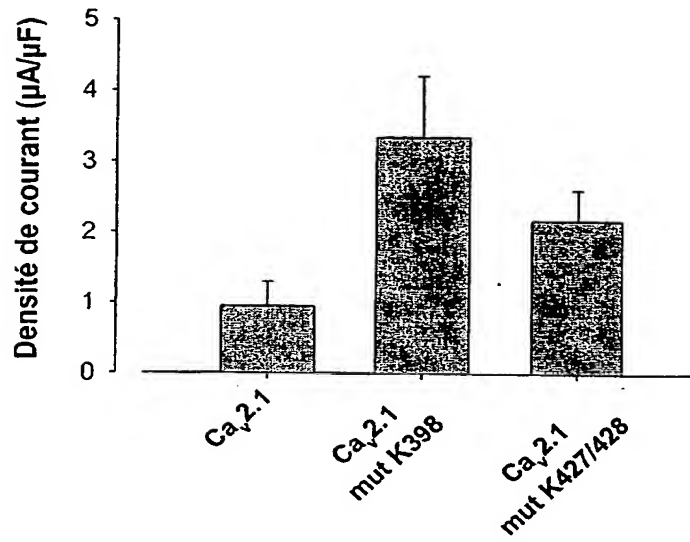
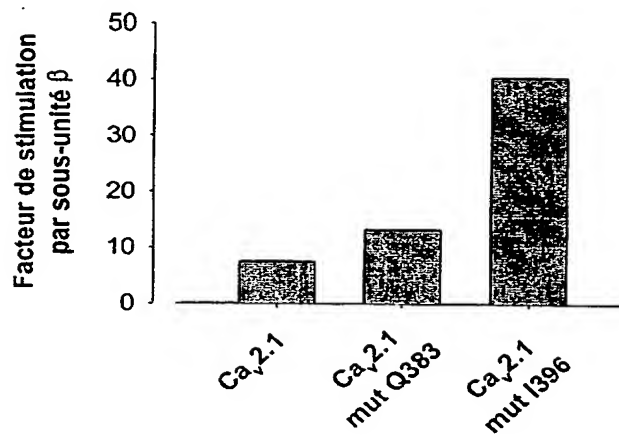


FIGURE 7 :





## SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> UTILISATION DE FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE LA SOUS-UNITE  $\alpha$ -1 DES CANAUX CALCIQUES, COMPORTANT LE CAS ECHEANT DES MUTATIONS, POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE

<130> IFB 01AE CNR CANA

<140> FR0110117

<141> 2001-07-27

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 384

<212> DNA

<213> lapin

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (384)

<223>

<400> 1

tca ggg gag ttt gcc aaa gaa agg gag cgg gtg gag aac cgg cgc gca	48
Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala	
1 5 10 15	
ttc ctg aag ctg cgg cgg cag cag cag att gaa cgc gag ctc aac ggg	96
Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly	
20 25 30	
tac atg gag tgg atc tca aaa gca gaa gag gtg atc ctc gca gag gac	144
Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp	
35 40 45	
gag acc gac gtg gag cag aga cat ccc ttt gat gga gct ctg cgg aga	192
Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg	
50 55 60	
gcc act atc aag aag agc aag acg gac ctg ctc cac cca gag gag gcg	240
Ala Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala	
65 70 75 80	
gag gat cag ctg gcc gac atc gcc tcc gtg ggg tct ccc ttt gcc cga	288
Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg	
85 90 95	

gcc agc att aaa agt gcc aag ctg gag aac tcg agt ttt ttc cac aaa 336  
 Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys  
                   100                  105                  110

aaa gag agg aga atg cgt ttc tac atc cgt cgc atg gtc aaa act cag 384  
 Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
                   115                  120                  125

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> lapin

<400> 2

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala  
 1                  5                  10                  15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly  
                   20                  25                  30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp  
                   35                  40                  45

Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg  
                   50                  55                  60

Ala Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala  
 65                  70                  75                  80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg  
                   85                  90                  95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys  
                   100                  105                  110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
                   115                  120                  125

<210> 3

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

tca ggg gag ttt gcc aaa gaa agg gaa cgg gtg gag aac cgg cgg gct	48
Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala	
1 5 10 15	

ttt ctg aag ctg agg cgg caa caa cag att gaa cgt gag ctc aat ggg	96
Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly	
20 25 30	

tac atg gaa tgg atc tca aaa gca gaa gag gtg atc ctc gcc gag gat	144
Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp	
35 40 45	

gaa act gac ggg gag cag agg cat ccc ttt gat gga gct ctg cgg aga	192
Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg	
50 55 60	

acc acc ata aag aaa agc aag aca gat ttg ctc aac ccc gaa gag gct	240
Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala	
65 70 75 80	

gag gat cag ctg gct gat ata gcc tct gtg ggt tct ccc ttc gcc cga	288
Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg	
85 90 95	

gcc agc att aaa agt gcc aag ctg gag aac tcg acc ttt ttt cac aaa	336
Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys	
100 105 110	

aag gag agg agg atg cgt ttc tac atc cgc cgc atg gtc aaa act cag	384
Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln	
115 120 125	

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp
35 40 45

Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg  
 50 55 60

Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg  
 85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys  
 100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
 115 120 125

<210> 5

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr  
 1 5 10 15

Cys Gly Val Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His  
 20 25 30

Arg

<210> 6

<211> 165

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(165)

<223>

<400> 6

atc acc ttc cag gag caa ggg gac aag atg atg gag gaa tac agc ctg 48  
 Ile Thr Phe Gln Glu Gln Gly Asp Lys Met Met Glu Glu Tyr Ser Leu  
 1 5 10 15

gag aaa aat gag agg gcc tgc att gat ttc gcc atc agc gcc aag ccg 96  
 Glu Lys Asn Glu Arg Ala Cys Ile Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro  
 20 25 30

ctg acc cga cac atg ccg cag aac aag cag agc ttc cag tac cgc atg 144  
 Leu Thr Arg His Met Pro Gln Asn Lys Gln Ser Phe Gln Tyr Arg Met  
 35 40 45

tgg cag ttc gtg gtg tct ccg 165  
 Trp Gln Phe Val Val Ser Pro  
 50 55

<210> 7

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Thr Phe Gln Glu Gln Gly Asp Lys Met Met Glu Glu Tyr Ser Leu  
 1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Arg Ala Cys Ile Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro  
 20 25 30

Leu Thr Arg His Met Pro Gln Asn Lys Gln Ser Phe Gln Tyr Arg Met  
 35 40 45

Trp Gln Phe Val Val Ser Pro  
 50 55

<210> 8

<211> 165

<212> DNA

<213> lapin

<400> 8

atcaccttcc aggagcaggg cgacaagatg atggaggagt acagcttgga gaaaaacgag 60

agggcctgca tcgacttcgc catcagtgcc aagccgctga ccaggcacat gccccagaac 120

aagcagagct tccagtaccg catgtggcag ttcgtggtgt ccccg 165

<210> 9

<211> 128

<212> PRT

<213> lapin

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> X représente Q, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> X représente W, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> X représente I, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> X représente K, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (68)..(69)

<223> X représente K, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 9

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala  
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Xaa Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly  
20 25 30

Tyr Met Glu Xaa Xaa Ser Xaa Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp  
35 40 45

Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg  
50 55 60

Ala Thr Ile Xaa Xaa Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg  
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys  
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
115 120 125

<210> 10

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> X représente Q, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> X représente W, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> X représente I, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> X représente K, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (68)..(69)

<223> X représente K, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 10

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala  
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Xaa Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly  
20 25 30

Tyr Met Glu Xaa Xaa Ser Xaa Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp  
35 40 45

Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg  
50 55 60

Thr Thr Ile Xaa Xaa Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg  
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys  
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
115 120 125

<210> 11

<211> 128

<212> PRT

<213> lapin

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE



<222> (63)..(64)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 11

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala  
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Xaa Glu Leu Asn Gly  
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp  
35 40 45

Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Xaa Xaa  
50 55 60

Ala Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg  
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys  
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
115 120 125

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (63)..(64)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 12

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala  
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Xaa Glu Leu Asn Gly  
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp  
35 40 45

Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Xaa Xaa  
50 55 60

Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg  
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys  
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
115 120 125

<210> 13

<211> 128

<212> PRT

<213> lapin

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> X représente E, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 13

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala  
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Xaa Xaa Leu Asn Gly  
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp  
35 40 45

Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg  
50 55 60

Ala Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg  
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys  
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
115 120 125

<210> 14

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> X représente E, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 14

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala  
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Xaa Xaa Leu Asn Gly  
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp  
35 40 45

Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg  
50 55 60

Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg  
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys  
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln  
115 120 125



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2827867

N° d'enregistrement  
nationalFA 609926  
FR 0110117

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	BICHET DELPHINE ET AL: "Reversibility of the Ca <sup>2+</sup> channel alpha-beta subunit interaction." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 277, no. 3, 2 novembre 2000 (2000-11-02), pages 729-735, XP002198858 ISSN: 0006-291X le document en entier plus particulièrement * page 730 *	1,2, 5-10, 17-19	C07K14/47 G01N33/53 G01N33/68 C12Q1/02
A	* page 731; figure 1 * * page 733; figure 3 * * page 734, colonne de gauche *	3,4, 11-16,20	
X	HERING STEFFEN ET AL: "Molecular determinants of inactivation in voltage-gated Ca <sup>2+</sup> channels." JOURNAL OF PHYSIOLOGY (CAMBRIDGE), vol. 528, no. 2, 15 octobre 2000 (2000-10-15), pages 237-249, XP001064791 ISSN: 0022-3751 * page 242 - page 243 *	1,2,5,9, 10,20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)  C07K C12N G01N
A	--- -/--	7,8, 11-19	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 mai 2002		Le Cornec, N	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

5

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2827867

N° d'enregistrement  
national

FA 609926  
FR 0110117

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,A	M. PRAGNELL ET AL: "Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha1-subunit" NATURE., vol. 368, 3 mars 1994 (1994-03-03), pages 67-70, XP002198859 MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON., GB ISSN: 0028-0836 * le document en entier *	1-20	
A	US 5 876 958 A (HARPOLD MICHAEL M ET AL) 2 mars 1999 (1999-03-02) * revendications *	1-20	
A	DE WAARD MICHEL ET AL: "IDENTIFICATION OF CRITICAL AMINO ACIDS INVOLVED IN ALPHA-1-BETA INTERACTION IN VOLTAGE-DEPENDENT CA-2+ CHANNELS" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 380, no. 3, 1996, pages 272-276, XP002155228 ISSN: 0014-5793 * le document en entier *	1-20	
A	DE WAARD MICHEL ET AL: "Properties of the alpha-1-beta Anchoring Site in Voltage-dependent Ca-2+ Channels." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 20, 1995, pages 12056-12064, XP002198860 ISSN: 0021-9258 --- -/--		
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 mai 2002		Le Cornec, N	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

5

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2827867

N° d'enregistrement  
nationalFA 609926  
FR 0110117

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	HOFMANN F ET AL: "Voltage-dependent calcium channels: From structure to function." REVIEWS OF PHYSIOLOGY BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY, vol. 139, 1999, pages 33-87, XP001076646 1999 Springer-Verlag; Springer-Verlag New York, Inc. Heidelberger Platz 3, D-1000 Berlin, Germany; 175 Fifth Avenue, New York, New York 10010, USA ISBN: 3-540-65694-4		
A	BICHET DELPHINE ET AL: "The I-II loop of the Ca <sup>2+</sup> channel alpha subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit." NEURON., vol. 25, no. 1, janvier 2000 (2000-01), pages 177-190, XP002198861 ISSN: 0896-6273 * le document en entier *	1-20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
T	GEIB SANDRINE ET AL: "The interaction between the I-II loop and the III-IV loop of Cav2.1 contributes to voltage-dependent inactivation in a beta-dependent manner." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 12, 22 mars 2002 (2002-03-22), pages 10003-10013, XP002198862 March 22, 2002 ISSN: 0021-9258		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 mai 2002		Le Cornec, N	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

5

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

2827867

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE****RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0110117 FA 609926**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 16-05-2002

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5876958      A	02-03-1999	US 5429921 A	04-07-1995
		US 5386025 A	31-01-1995
		US 6096514 A	01-08-2000
		AT 191920 T	15-05-2000
		AU 677571 B2	01-05-1997
		AU 2495792 A	16-03-1993
		CA 2113203 A1	04-03-1993
		DE 69230938 D1	25-05-2000
		DE 69230938 T2	12-10-2000
		DK 598840 T3	02-10-2000
		EP 0598840 A1	01-06-1994
		EP 0992585 A2	12-04-2000
		ES 2147184 T3	01-09-2000
		GR 3033961 T3	30-11-2000
		JP 6509717 T	02-11-1994
		WO 9304083 A1	04-03-1993
		US 5874236 A	23-02-1999
		US 5846757 A	08-12-1998
		US 5851824 A	22-12-1998
		US 5792846 A	11-08-1998
		CA 2074719 A1	21-08-1991
		EP 0515569 A1	02-12-1992
		JP 5503431 T	10-06-1993
		WO 9113077 A1	05-09-1991
		US 5726035 A	10-03-1998
		US 5686241 A	11-11-1997
		US 5710250 A	20-01-1998
		US 5407820 A	18-04-1995
		AT 139542 T	15-07-1996
		AU 3548089 A	03-11-1989
		DE 68926713 D1	25-07-1996
		DE 68926713 T2	14-11-1996
		DK 240090 A	04-10-1990
		EP 0424397 A1	02-05-1991
		JP 4503152 T	11-06-1992
		JP 3066398 B2	17-07-2000
		NO 904284 A	04-12-1990
		WO 8909834 A1	19-10-1989
		US 5618720 A	08-04-1997
		US 6013474 A	11-01-2000

EPO FORM P0465



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

***This Page Blank (uspto)***